



## Análisis del NPY hipotalámico inducido por complicaciones nutricionales en la reproducción

Leticia Manuel Apolinar, Erika García Díaz, Miriam Ruiz Albarrán, Leticia Damasio Santana, Marcelino Hernández-Valencia

### RESUMEN

**Antecedentes:** la desregulación en la disponibilidad de sustratos energéticos en la vida prenatal o posnatal predisponde a la aparición de procesos de adaptación metabólica y hormonal que persisten a lo largo de la vida. Así, en la etapa de reproducción, el estado de desnutrición materna desencadena bajo peso del feto al nacimiento e induce cambios en el hipotálamo, donde se integran las señales nutricionales y el equilibrio energético mediante sistemas hormonales, como la leptina y el neuropeptido Y (NPY).

**Objetivo:** analizar el efecto de la desnutrición fetal en la expresión del receptor de NPY1 hipotalámico.

**Método:** se utilizaron ratas Sprague Dawley con restricción de alimento al 50% y se obtuvieron crías de bajo peso al nacimiento (grupo BPN). Al destete se alimentaron con dieta hipercalórica. A las 2 y 12 semanas de edad se analizó con RT-PCR la expresión del receptor de NPY1 en el hipotálamo.

**Resultados:** en el grupo de bajo peso fetal, el peso corporal al nacimiento fue menor que el de los controles (C), ( $p<0.001$ ); sin embargo, de las 2 hasta las 12 semanas aumentaron de peso ( $p<0.001$ ). A las dos semanas, la expresión del receptor de NPY1 en el hipotálamo fue mayor en el grupo de bajo peso fetal al nacimiento que en el control, con una  $p<0.05$ .

**Conclusión:** los resultados sugieren que la desnutrición intrauterina puede asociarse con alteraciones desde la etapa fetal que inducen cambios para optimizar el equilibrio energético, donde participa el NPY mediante aumento de la expresión del receptor NPY1 en el hipotálamo, que genera hiperfagia cuando hay disposición de alimento a libre demanda, quizás debido a las adaptaciones de la recuperación del crecimiento.

**Palabras clave:** desnutrición fetal, hipotálamo, cerebro, neuropeptido Y

### ABSTRACT

**Background:** Deregulation in the availability of food in prenatal and postnatal life, predisposes to the development of processes of metabolic and hormonal adaptation that persist throughout life. Thus, in reproducing a state of malnutrition triggers a low birth weight (LBW). Considering that induces changes in the brain, the hypothalamus integrates nutritional signals also participate in the energy balance through hormonal systems such as leptin and neuropeptide Y (NPY).

**Objective:** Analyze the effect of fetal undernutrition in the expression of NPY1 hypothalamic receptor.

**Methods:** Sprague Dawley rats were used with food restriction to 50% in pregnancy compared control group (C); was obtained in offspring a low birth weight (LBW group), after weaning were fed high-calorie diet, at 2 and 12 weeks-old with the hypothalamus by RT-PCR was analyzed receptor expression NPY1.

**Results:** Body weight at birth was lower in the LBW vs control group ( $p <0.001$ ), but at 2 to 12 weeks increased ( $p <0.001$ ), the expression in the hypothalamus NPY1 receptor was higher in group LBW vs C at 2 weeks  $p <0.05$ .

**Conclusions:** These results suggest that in the reproduction with presence of malnutrition induced changes to optimize their energy balance, with an increase in expression in hypothalamic NPY1 receptor, generating a hyperphagia when food is available. Possibly secondary to adaptations of catch up growth.

**Key words:** fetal undernutrition, hypothalamus, brain, neuropeptide Y

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. México, DF.

Correspondencia: Dra. Leticia Manuel Apolinar. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Hospital de Especialidades, CMN-IMSS. Av. Cuauhtémoc 330, colonia Doctores. México 06720, DF. Correo electrónico: letymamu@yahoo.com.mx

Recibido: diciembre 2011. Aceptado: enero 2012

Este artículo debe citarse como: Manuel-Apolinar L, García-Díaz E, Ruiz-Albarrán M, Damasio-Santana L, Hernández-Valencia M. Análisis del NPY hipotalámico inducido por complicaciones nutricionales en la reproducción. Rev Mex Reprod 2012;4(3):110-115.

**E**n las últimas décadas, diversas áreas de investigación en la reproducción han sugerido que los eventos implicados en el desarrollo fetal tienen efectos a largo plazo e influyen en la salud durante la vida adulta.<sup>1</sup> En la actualidad se conocen los factores que interactúan con la expresión de genes *in utero* y establecen patrones fisiológicos y estructurales relacionados con la supervivencia del individuo. La programación de la obesidad puede darse por medio de alteraciones permanentes de una o más vías relevantes durante el desarrollo embrionario y perinatal. Algunas no sólo influyen en el sujeto sino que también producen efectos que alteran la programación de generaciones futuras.<sup>2</sup> Así, una de las variables biológicas que mayor repercusión tiene en la salud a largo plazo, luego de la desnutrición intrauterina, es el crecimiento. El crecimiento de un individuo está condicionado por la interacción entre el potencial genético y el ambiente; a su vez, la capacidad de recuperación que tenga un desnutrido depende de la magnitud del crecimiento recuperado o “*catch up growth*”.<sup>3</sup> Así, un aspecto importante del proceso de desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos para la obesidad se basa en el entendimiento de los efectos de la programación fetal en el sistema neuroendocrino y su relación con las alteraciones en los procesos fisiológicos y psicológicos que controlan el apetito y la regulación del peso corporal.

La leptina es una hormona producto del gen *ob*, un péptido con peso molecular de 16 kDa, producida por los adipocitos, que informa al cerebro del estado de los depósitos corporales de energía y, por tanto, funciona como un sensor del equilibrio energético. La leptina también se ha relacionado con los cambios periféricos de la regulación energética, como la resistencia a la insulina.<sup>4</sup> En consecuencia, su acción central está mediada por péptidos, entre los que destaca el neuropéptido Y. Así, la leptina regula el consumo de alimentos y el gasto de energía.

El neuropéptido Y es un péptido orexigénico que se sintetiza en las neuronas del núcleo arcuato (ARC).<sup>5</sup> La administración intracerebrovascular (ICV) del NPY da como resultado hiperfagia y aumento del peso corporal;<sup>6</sup> también disminuye el gasto de energía, estimula episodios de alimentación y aumenta la ingestión de alimento, la duración y la frecuencia de la misma.<sup>7</sup> El NPY es un

regulador importante del equilibrio energético.<sup>8</sup> En la actualidad se han descrito cinco subtipos distintos de receptores del NPY (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6). De éstos, el receptor Y1 tiene un papel importante en la regulación del consumo de alimento,<sup>8,9</sup> mientras que el receptor Y5 no sólo media la respuesta al alimento (Hwa et al, 1999), sino que también contribuye a la homeostasis de regulación de la energía.<sup>10</sup> Por esto se propone que el NPY es más importante en el estímulo de la ingestión cuando las reservas energéticas están gravemente afectadas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue: determinar desde etapas tempranas de la gestación el efecto de la desnutrición fetal en la expresión del receptor de NPY1 hipotalámico asociado con el bajo peso fetal al nacimiento y con la recuperación del peso posnatal.

## MATERIAL Y METODO

Estudio x en el que se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley: 20 machos y 20 hembras nulíparas de tres meses de edad, con peso de 200-250 g. Los animales permanecieron en el bioriego del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN S-XXI, IMSS). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Nacional del CMN Siglo XXI, IMSS. Los animales se utilizaron de acuerdo con lo señalado en la Norma Oficial Mexicana (5.1.3.1, NOM-062-ZOO-1999): se mantuvieron en condiciones convencionales de bioriego. Con base en el modelo experimental utilizado en el laboratorio,<sup>11</sup> se cruzaron y con la identificación del tapón vaginal se consideró el día 1 de la gestación. Al comienzo de la segunda semana de gestación al grupo experimental se le restringió el alimento al 50% respecto del grupo control (C). La ingestión de agua fue *ad libitum*. Al nacimiento de las crías, las madres del grupo con restricción de alimento fueron alimentadas de manera normal. Las crías se pesaron y seleccionaron por sexo. Se homogeneizaron en camadas de 8-9 machos en cajas separadas por camada y se alimentaron por lactancia hasta los 21 días de edad posnatal. Después del destete, las crías del grupo C se alimentaron con la dieta control y las crías del grupo con restricción de la dieta materna con bajo peso al nacimiento se alimentaron con la dieta hipercalórica (60% de lípidos) HL, grupo bajo peso fetal al nacimiento+HL.

**Peso corporal.** Enseguida del nacimiento, las crías del grupo C y las de bajo peso fetal al nacimiento nacieron. El peso se registró hasta las 12 semanas de edad posnatal.

#### Prueba RT-PCR para la expresión del mARN de los receptores NPY1 en el hipotálamo

La extracción del ARN total fue mediante el método de trizol. Para evidenciar la integridad del ARN se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio. Posteriormente se obtuvo una cadena complementaria de ADN (cDNA) a partir de mARN de muestras de tejido hipotalámico, que fueron sometidas a la acción de una enzima transcriptasa reversa. Una vez con el cADN y con los primers específicos de los genes se realizó la reacción de PCR (Cuadro 1). Para determinar la expresión del gen del receptor del neuropéptido Y 1 (Npy1r, NPY1), así como para el gen constitutivo y de normalización tubulina (Tub  $\beta$ 3), se utilizó la técnica de RT-PCR.

**Cuadro 1.** Cebadores usados para la determinación de la expresión de receptores hipotalámicos

Gen	Secuencia	Producto de PCR (pb)
Npy1r	<b>F</b> 5'-TCTTCTCTGCCCTCGTGATC- <b>R</b> 5'-TGAACGCCGCAAGTGATACA-	73
Tubb3	<b>F</b> 5'-TCAGCGTGGTGCCCTCAC- <b>R</b> 5'-GTGAGCTAGGCACCGCT-	370

La PCR se realizó con el equipo Pyrostart (Fermentas). Las condiciones de PCR se sometieron a desnaturización a 95 °C durante cinco minutos. Se realizaron 35 ciclos designados para la reacción con las siguientes condiciones: 95 °C durante 1 minuto (desnaturalización), 60 °C durante un minuto (alineamiento), 72 °C durante un minuto (elongación); con elongación final de 72 °C durante siete minutos se utilizó un termociclador Eppendorf, Egradient S. El producto de PCR se evidenció mediante electroforesis al 2% de agarosa y bromuro de etidio; la determinación de la densitometría fue en un Gel Logic.

**Análisis estadísticos.** Los datos obtenidos se analizaron con estadística simple con promedio  $\pm$  desviación

estándar. La diferencia estadística se consideró para una  $p<0.001$  entre el grupo (C) y el grupo de bajo peso fetal al nacimiento. El análisis intergrupo fue mediante prueba t de Student.

## RESULTADOS

El peso corporal de las madres durante la gestación se obtuvo de la desnutrición materna de los últimos nueve días de gestación. La restricción al 50% del alimento redujo, al final de la gestación, el peso corporal de las madres del grupo con restricción de 10.5% con respecto al grupo C. Es así como se demuestra que la restricción de alimento durante los 12-21 días de gestación reduce el peso corporal de las madres; de esta manera se confirma el estado inducido de desnutrición materna.

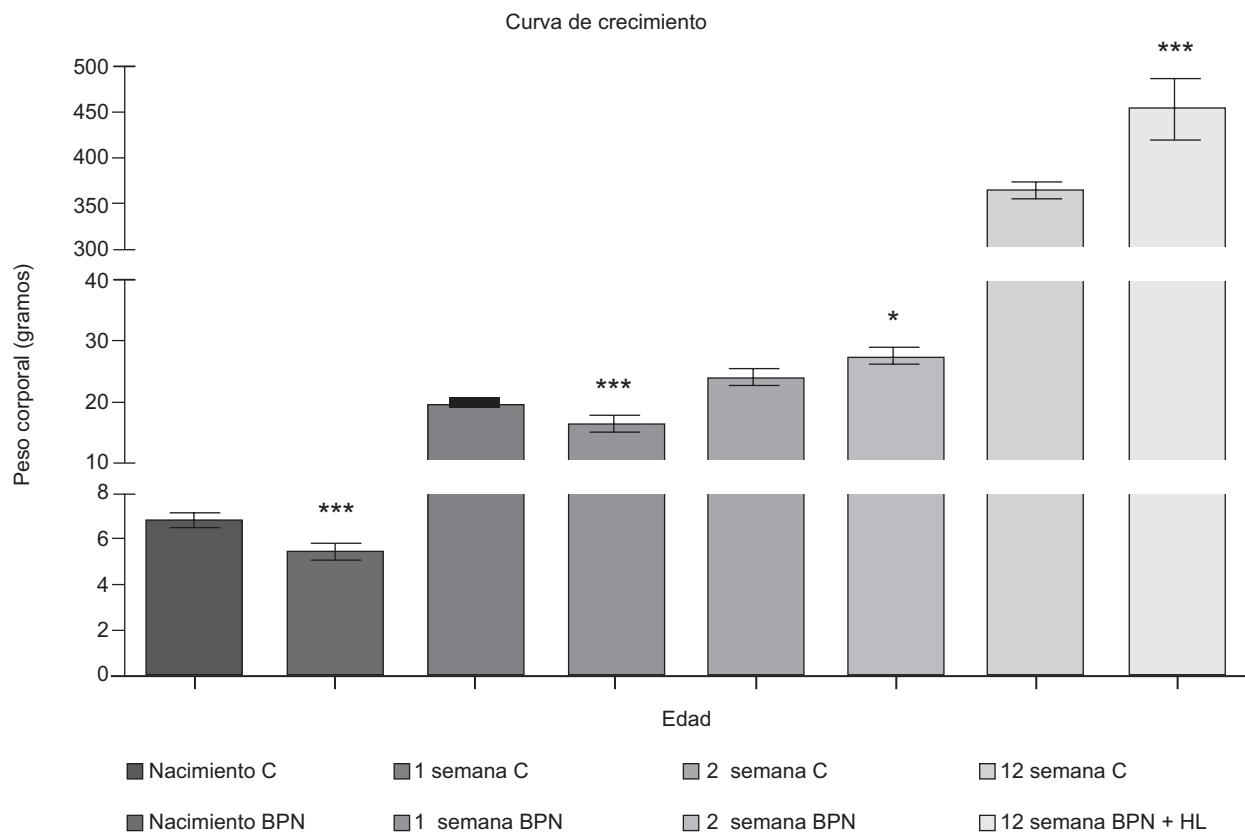
#### Peso corporal en crías de madres con restricción de alimento durante la gestación

Las crías de madres alimentadas con restricción de alimentos durante la reproducción se afectaron porque tuvieron bajo peso fetal al nacimiento vs los controles ( $p<0.001$ ). Sin embargo, a partir de la vida posnatal las madres en lactancia de estas crías se alimentaron a libre demanda.

El peso corporal de los grupos de estudio se registró desde el nacimiento hasta las 12 semanas de edad. El peso de las crías producto de la desnutrición materna al nacimiento (grupo bajo peso fetal al nacimiento) se redujo 17.9% con respecto al control, con diferencias significativas ( $p<0.001$ ). Estas diferencias de peso entre los grupos desaparecieron en la segunda semana porque el peso se incrementó 12.5% en el grupo de bajo peso fetal al nacimiento ( $p<0.05$ ), lo que indica recuperación del crecimiento. El peso del grupo con bajo peso fetal al nacimiento a las 12 semanas de edad, cuando ya lo estaban alimentado con la dieta HL, permaneció por arriba, con incremento de 22.8% ( $p<0.001$ ). Figura 1

Ingestión de dieta hiperlipídica después de bajo peso al nacimiento

A los 21 días después del destete, el grupo control se alimentó con una dieta control y el grupo con bajo peso fetal al nacimiento con una dieta HL. A partir de la cuarta semana y hasta las 12 semanas de edad las ratas alimentadas con la dieta HL consumieron más



**Figura 1.** Peso corporal de ratas controles y obesas. Efecto de la restricción de alimento en la gestación y la dieta hipercalórica en el grupo de bajo peso fetal al nacimiento comparado con el grupo C. Los pesos considerados fueron: al nacimiento, 1, 2 y 12 semanas de edad. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. La diferencia estadística fue de  $*p<0.05$ ;  $***p<0.001$  entre el grupo (C) y el grupo de bajo peso fetal al nacimiento. La comparación entre grupos fue con prueba t Student.

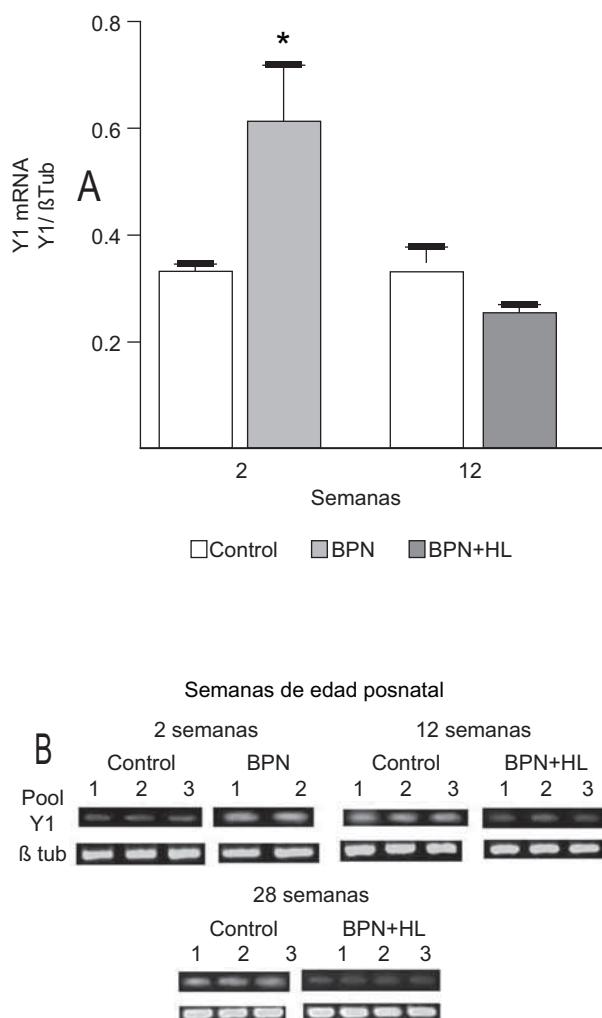
alimento en comparación con el control. Las diferencias en el consumo de alimento por gramo se consideraron estadísticamente significativas con una  $p<0.05$ .

#### Expresión de NPY1 en el hipotálamo

Por lo que se refiere a los niveles de expresión del mARN del receptor Y1 en el hipotálamo, fue mayor en 25% en el grupo de bajo peso fetal al nacimiento vs el grupo C a las dos semanas, con una  $p<0.05$ . Estas diferencias no permanecen cuando los animales se alimentan con la dieta HL a las 12 semanas de edad, porque disminuyen. Si bien los niveles de expresión del mARN del receptor Y1 tienden a disminuir con la edad y con la dieta, estas diferencias no son significativas comparadas con el control de la misma edad (Figura 2).

#### DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la restricción de calorías durante la gestación resulta en bajo peso al nacimiento; sin embargo, en la vida posnatal inmediata en las ratas con alimento a libre demanda se encontró hiperfagia. El aumento en la ingestión de alimento condujo a la recuperación del crecimiento a las dos semanas de edad, sin que se hubiera modificado el tipo de alimento. La aceleración en la recuperación del crecimiento quizás fue benéfica a corto plazo, porque permitió a las ratas supervivir hasta la edad reproductiva. Sin embargo, con el consumo de una dieta HL después del destete ocurren adaptaciones que resultan perjudiciales para la salud. Algunos estudios experimentales previos sugieren que



**Figura 2.** Comparación de la expresión del receptor NPY1 en las diferentes edades de estudio. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar. La diferencia significativa es de  $*p<0.01$ . Prueba t de Student.

el tipo de manipulación de la dieta materna durante la gestación puede dar como resultado diferentes fenotipos: hipofágico o hiperfágico. Cuando las hembras gestantes se alimentan con una dieta baja en proteínas tienen crías con hipofagia.<sup>12</sup> Sin embargo, las crías de madres con desnutrición gestacional severa (restricción de 70% de la ingestión normal de alimento) tienen hiperfagia hasta la vida adulta cuando se alimentan con una dieta HL.<sup>13</sup>

Los resultados de este estudio confirman la recuperación del crecimiento observado en otros estudios en

modelos animales,<sup>14,15</sup> lo que indica que la restricción de nutrientes *in utero* tiene un efecto importante en el crecimiento postnatal. Los estudios realizados por Ozanne y Hales,<sup>14</sup> así como por Desai y su grupo<sup>16</sup> muestran que la programación *in utero* da origen a la obesidad, pero no a diabetes mellitus tipo 2.

El NPY se ha identificado como un potente agente orexigénico sintetizado por las neuronas del núcleo arcuato hipotalámico. La concentración plasmática del NPY en humanos varía desde límites de 0.25 hasta 129 pM.<sup>17</sup> De forma similar, la medición de la concentración del NPY en ratas varía en la bibliografía desde 25 hasta 3000 pM. Esto podría deberse a que el NPY no sólo ejerce su efecto en el hipotálamo, sino también en el sistema nervioso periférico, debido a sus diversas acciones biológicas, en las que se incluye la regulación cardiovascular, cognición, estrés, modulación del sistema neuroendocrino y regulación del apetito, por lo que podría modular diversas acciones biológicas a través de sus diferentes receptores. Existen estudios en los que no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones del NPY en plasma de ratas alimentadas con dieta HL comparadas con controles.<sup>18</sup> Esto sugiere que las concentraciones del NPY en el plasma a nivel periférico no son sensibles a los cambios nutricionales ni a la ingestión de alimento. También se ha reportado que las dietas HL altas en grasas saturadas producen sobre-regulación en la expresión del NPY en comparación con dietas HL altas en grasas insaturadas, o bien, con dietas equilibradas.<sup>19</sup> En este trabajo la expresión del receptor Y1 fue mayor a la edad de dos semanas, momento en el que se manifiesta la recuperación del peso corporal sin influencia de la dieta HL. Por el contrario, se encontró que los niveles de expresión del mARN del receptor Y1 disminuyeron significativamente a las 12 semanas en el grupo de bajo peso fetal al nacimiento+HL. Esta disminución podría ser el resultado de una regulación negativa en caso de que las concentraciones de NPY se encontraran elevadas a las 12 semanas de edad. Esto sugeriría que la programación temprana de la ganancia de peso corporal y de la hiperfagia es consecuencia de la regulación alterada de la ingestión de alimentos. Estas alteraciones pueden atribuirse a cambios en los niveles de expresión del receptor Y1 hipotalámico involucrado en la regulación del gasto energético, potenciado por la

dieta HL observada en la edad adulta, lo que podría significar que la disminución en la expresión del receptor Y1 está asociada con la inducción de obesidad y diabetes. En conclusión, estos resultados sugieren que la desnutrición intrauterina determina una programación en la vida fetal que estimula una sobrealimentación compensatoria en la vida posnatal, con recuperación nutricional a la edad de dos semanas y se manifiesta con aumento en la expresión del receptor de NPY1 en el hipotálamo, quizás debido a una adaptación del gasto energético en respuesta a la desnutrición fetal.

## REFERENCIAS

1. Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993; 36(1): 62-67.
2. Hall JG. The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists. *Clin Genet* 2007; 72(2):67-73.
3. Boersma B, Wit JM. Catch up growth. *Endocr Rev* 1997; 18(5):646-661.
4. Calaf J. Pubertad normal y sus alteraciones. En: Vanrell JA, Calaf J, Balasch, Viscosillas P, editores. *Fertilidad y esterilidad humanas II. Endocrinología ginecológica y anticoncepción.* 2.a ed. Barcelona: Masson; 2000;102-112.
5. Tatamoto K, Mutt V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 1980;285(5764):417-418.
6. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 1993;133(4):1753-1758.
7. Bivens CLM, Thomas WJ, Stanley GB. Similar feeding patterns are induced by perifornical neuropeptide Y injection and by food deprivation. *Brain Res* 1998;782(1-2):271-280.
8. Kanatani A, Hata M, Mashiko S, Ishihara A, Okamoto O, et al. A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: Effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814. *Mol Pharmacol* 2001; 59(3):501-505.
9. Blomqvist AG, Herzog H. Y-receptor subtypes -how many more? *Trends Neurosci* 1997; 20(7):294-298.
10. Mashiko S, Ishihara A, Iwaasa H, Sano H, et al. intracerebroventricular infusion of D-Trp34NPY. *Endocrinology* 2003;144(5):1793-1801.
11. Manuel-Apolinar L, Zárate A, Rocha L, Hernández-Valencia M. Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in mice. *Arch Med Res* 2010;41:240-245.
12. Sellayah D, Sek K, Anthony FW, Watkins AJ, et al. Appetite regulatory mechanisms and food intake in mice are sensitive to mismatch in diets between pregnancy and postnatal periods. *Brain Res* 2008; 27(1237):146-152.
13. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(1):E83-E87.
14. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004; 427(6973):411-412.
15. Ozanne SE, Lewis R, Jennings BJ, Hales CN. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci* 2004;106(2):141-145.
16. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288(1):R91-96.
17. Corder R, Lowry PJ. An immunoradiometric assay for the measurement of neuropeptide Y in plasma. *Peptides* 1985; 6(6):1195-1200.
18. Wang C, Yang N, Wu S, Liu L, Sun X, Nie S. Difference of NPY and its receptor gene expressions between obesity and obesity resistant rats in response to high-fat diet. *Horm Metab Res* 2007; 39(4):262-267.
19. Huang XF, Xin X, McLennan P, Storlien L. Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab* 2004; 6(1):35-44